

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平2-84181

⑬ Int. Cl.⁵

C 12 N 15/12
A 61 K 39/395
C 07 K 7/06

識別記号

ZNA

庁内整理番号

T
Z

8829-4C
8318-4H※

⑭ 公開 平成2年(1990)3月26日

審査請求 未請求 請求項の数 4 (全10頁)

⑮ 発明の名称 癌抑制遺伝子、その単離法、それがコードするペプチド、及び抗体

⑯ 特 願 昭63-235737

⑰ 出 願 昭63(1988)9月20日

⑱ 発 明 者 井 川 洋 二 茨城県つくば市高野台3丁目1番1 理化学研究所ライフ
サイエンス筑波研究センター内
⑱ 発 明 者 野 田 亮 茨城県つくば市高野台3丁目1番1 理化学研究所ライフ
サイエンス筑波研究センター内
⑱ 発 明 者 北 山 仁 志 茨城県つくば市高野台3丁目1番1 理化学研究所ライフ
サイエンス筑波研究センター内
⑱ 発 明 者 杉 本 喜 憲 茨城県つくば市高野台3丁目1番1 理化学研究所ライフ
サイエンス筑波研究センター内
⑲ 出 願 人 理 化 学 研 究 所 埼玉県和光市広沢2番1号
⑳ 代 理 人 弁 理 士 中 村 稔 外7名

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称 癌抑制遺伝子、その単離法、
それがコードするペプチド、
及び抗体

2. 特許請求の範囲

(I) 下記のアミノ酸配列(I)～(XII)から成
る群から選ばれるアミノ酸配列で表されるペプ
チドをコードする癌抑制遺伝子。

(I) MREYKLVVLG¹ SGGVGKSALT² VQFVGQIFV³
KYOPTIEDSY⁴ RKQVEVDCQ⁵ CMLBILDTAG⁶
TEOPTAMRDL⁷ YMKNGGGFAL⁸ VYSITAQSTF⁹
NDLQDLREQI¹⁰ LRVKDTBDVP¹¹ NILVGNKCOL¹²
EDERVVGKBO¹³ GQNLARQWCH¹⁴ CAPLBSSAKS¹⁵
KINVNEIPYD¹⁶ LVROINRKTP¹⁷ VEKKKPKKKK¹⁸
CLLL¹⁹

(II) REYKLVVLG¹ SGGVGKSALT² VQFVGQIFV³
KYOPTIEDSY⁴ RKQVEVDCQ⁵ CMLBILDTAG⁶
TEOPTAMRDL⁷ YMKNGGGFAL⁸ VYSITAQSTF⁹
NDLQDLREQI¹⁰ LRVKDTBDVP¹¹ NILVGNKCOL¹²
EDERVVGKBO¹³ GQNLARQWCH¹⁴ CAPLBSSAKS¹⁵

KINVNEIPYD¹⁶ LVROINRKTP¹⁷ VEKKKPKKKK¹⁸
CLLL¹⁹

(III) REYKLVVLGS¹

(IV) GIPVEK¹

(V) KYOPTIEDSYRKQVE¹

(VI) TEOPT¹

(VII) KNGGGFALVYSIT¹

(VIII) NKCOL¹

(IX) ESSAKS¹

(X) INVNEIPYDLVRQI¹

(XI) KTPVEKKKPKKKK¹

(XII) アミノ酸配列(I)においてG¹⁸、G¹⁹、
A¹⁸またはT¹⁹を任意のアミノ酸と置換し
たもの。

(2) 請求項(1)記載のアミノ酸配列(I)～(XII)
から成る群から選ばれるアミノ酸配列で表わさ
れるペプチド。

(3) 請求項(2)記載のペプチドに対する抗体。

(4) 下記の工程A～Dを、A、B、C、Dまたは
A、C、B、Dの順に連結してなる請求項(1)記

載の癌抑制遺伝子の単離法。

- A. 腫瘍細胞又はトランスフォーム細胞に、動物細胞用選択マーカーを持ったcDNA発現ライブラリー-DNAプラスミドをトランスフェクション又はそれに準ずる方法により導入する工程。
- B. 選択マーカーを用いて、cDNAプラスミドを取込んだ細胞を選別する工程。
- C. 腫瘍細胞としての性質が失われた細胞クローンを単離する工程。
- D. 工程Cで得られた細胞より、cDNAを抽出し、これを含むプラスミドを構築し、大腸菌体内に導入してクローニングし、癌抑制活性を有するクローンを選別する工程。

明しつくすことはできないという事が分かる。しかし、「癌抑制遺伝子」の実体については、主に技術的な困難さ一活発に増えている細胞集団の中から増え方の遅いまれな細胞を取り出すことの困難さ一からその解明が遅れており、これまでにわずか2〜3の候補が単離されているに過ぎない。

本発明者は、癌遺伝子の1つ“ras”を与えると、著しい形態変化を起こし、完全に癌化(トランスフォーム)してしまうNIH/3T3というマウス細胞を材料として用い、この癌化細胞にDNA感染法(トランスフェクション)で遺伝子を導入した時に、形態の正常化した細胞(フラット・リパータント)が出現するかどうか(第1図)という検出法により、癌抑制作用を持つような遺伝子の探索を試みた(第2図)。

その結果、ヒト繊維芽細胞の中で働いている全遺伝子の中から、癌抑制作用を持つ一つの新しい遺伝子(Krev-1)を単離することに成功し、本発明を完成するに至ったものである。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、癌抑制遺伝子、その単離法、それがコードするペプチド及びそのペプチドに対する抗体に関する。

〔発明の背景〕

癌がある種の細胞機能の欠損によって起こるらしいということは古くから知られている。例えば癌細胞と正常細胞を融合させると、癌としての性質が消えることがしばしば観察される。また、遺伝性の癌においては、特定の遺伝子の欠落が原因となっているものが知られている。つまり、正常細胞の中には、癌の性質を抑える遺伝子(「癌抑制遺伝子」)が存在し、その“不活性化”が発癌に結びつくと考えられる。

一方、1980年代前半に発見されはじめ、現在も活発に研究が進められているいわゆる「癌遺伝子」は、これらとは逆に“活性化”した時に細胞に癌の性質を与えるものであるが、上述のような情況証拠から、これらの遺伝子だけでは癌を説

〔発明が解決しようとする課題〕

本発明の第1の目的は、癌抑制遺伝子およびその単離法を提供することである。

本発明の第2の目的は、癌抑制遺伝子がコードするペプチドを提供することである。

本発明の第3の目的は、癌抑制遺伝子がコードするペプチドに対する抗体を提供することである。

〔課題を解決するための手段〕

本発明の癌抑制遺伝子は、下記のアミノ酸配列(I)〜(XII)から成る群から選ばれるアミノ酸配列で表されるペプチドをコードする遺伝子である。

(I) MREYKLVVLG¹⁰ SGGVGKSALT²⁰ VOFVOGIFV³⁰
 KYDPTIEDSY⁴⁰ RKQVEVOCQ⁵⁰ CMLBILDTAG⁶⁰
 TEQPTANROL⁷⁰ YMKNGGPA⁸⁰ VYSITAOSTP⁹⁰
 NDLQDLRGO¹⁰⁰ LRYKDTEDVP¹¹⁰ MILVGNKCOL¹²⁰
 EDERVVGKEQ¹³⁰ GQNLARQW¹⁴⁰ CAPLESSAKS¹⁵⁰
 KINVNBIFFD¹⁶⁰ LVRQINRKT¹⁷⁰ VBKKPKKKK¹⁸⁰
 CLLL¹⁹⁰
 (II) RBYKLVVLG¹⁰ SGGVGKSALT²⁰ VOFVOGIFV³⁰

KYOPTIEDSY¹⁰ RKQVEVDCQ¹⁰ CMLEILDTAG¹⁰
 TEQFTAMRD¹⁰ YMKNGGPA¹⁰ VYSITAQSTF¹⁰
 NOLQDLREO¹⁰ LRVKOTEDVP¹⁰ MILVGNKCOL¹⁰
 EDBRVVGKB¹⁰ GQNLARQWCN¹⁰ CAFLESSAKS¹⁰
 KINVNBIFYD¹⁰ LVRQINRKT¹⁰ VEKKKPKKKS¹⁰
 CLLL¹⁰
 (III) REYKLVVLGS¹¹
 (IV) GIFVEK¹¹
 (V) KYOPTIEDSYRKQVE¹¹
 (VI) TEQFT¹¹
 (VII) KNGGPA¹¹LVYSIT¹¹
 (VIII) NKCOL¹¹
 (IX) ESSAKS¹¹
 (X) INVNBIFYLVRQ¹¹
 (XI) KTPVEKKKPKKKS¹¹

(XII) アミノ酸配列 (I) において G¹²、G¹³、
 A¹⁴ または T¹⁵ を任意のアミノ酸 (以下に示
 す 20 種類のアミノ酸) と置換したもの。
 本願明細書中、アミノ酸は以下の略記号を用い
 て表示する。

K : リジン R : アルギニン
 D : アスパラギン酸 E : グルタミン酸
 G : グリシン N : アスパラギン
 C : システイン S : セリン
 Y : チロシン
 A : アラニン V : バリン
 I : イソロイシン P : プロリン
 M : メチオニン W : トリプトファン
 H : ヒスチジン
 Q : グルタミン
 T : スレオニン
 L : ロイシン
 F : フェニルアラニン

本発明は、また、上記アミノ酸配列 (I) ~
 (XII) から成る群から選ばれるアミノ酸配列で
 表わされるペプチド、およびこのペプチドに対す

る抗体を提供するものである。

上記アミノ酸配列 (I) ~ (XII) で表される
 ペプチドをコードする癌抑制遺伝子は、たとえば
 次の工程 A ~ D を含む方法により単離することが
 できる。

- 腫瘍細胞又はトランスフォーム細胞に動物細胞選択マーカーを持った cDNA 発現ライブラリー DNA プラスミドをトランスフェクション又はそれに準ずる方法により導入する工程。
 - 選択マーカーを用いて、cDNA プラスミドを取込んだ細胞を選別する工程。
 - 腫瘍細胞としての性質の失われた細胞クローンを単離する工程。
 - 工程 C で得られた細胞より、cDNA を抽出し、これを含むプラスミドを構築し、このプラスミドを大腸菌体内に導入してクローニングし、癌抑制活性を有するクローンを選別する工程。
- 上記工程は、A、B、C、D の順、または A、C、B、D の順に行われる。
- 工程 C の、腫瘍細胞としての性質が失われた細胞

クローンを単離する方法としては、たとえば次のような方法がある。

- 培養器壁 (プラスチック製) への付着性の増加したものを選ぶ。
- 低濃度血清下で、細胞傷害性薬剤 (たとえば、プロモデオキシウリジン、フロデオキシウリジン、コルヒチン等) を作用させる。
- 浮遊培養下で、上記の薬剤を作用させる。
- 腫瘍細胞を選択的に凝集させるレクチン (たとえば、コンカナバリン A) を作用させる。
- グルタミン類似体 (たとえば DON (β-ジアゾ-5-オキソノルロイシン)) を作用させる。
- 温熱処理をする。
- トリプシン等の蛋白分解酵素にて長時間処理する。
- ウアバインで処理する。

上記方法のうち (i) が最も好ましい。

ペプチド (I) は、活性化 ras 遺伝子により癌化した細胞の悪性な形質を抑制する遺伝子の産物と

して本発明者が同定したものである。この蛋白は ras 蛋白と部分的に相同性を持つため、その類似性が癌抑制効果に寄与していると考えられる。

ペプチド (III)、(VII) は、ras 蛋白において GTP のリン酸基と、ペプチド (VI)、(VIII)、(IX) は ras 蛋白において GTP のグアニンと、ペプチド (V) は ras 蛋白において標的蛋白と結合する部位にそれぞれ相当する。ペプチド (VI)、(X) は、ras 蛋白において蛋白の活性化に関係し、ペプチド (XI) は、このペプチド (I) において、ras 蛋白と比べ最も違いの大きい部分である。従って、これらのペプチド断片は、それぞれペプチド (I) 全体の持つ癌抑制活性の一部又は全部を担っている可能性が有る。こうした、ペプチドは、合成することも可能であるが、DNA を用いて組換え DNA 技術により生産することもできる。また、これらのペプチドに対する抗体は、診断や、類似の癌抑制蛋白の発現に有用であると予想される。

本発明の癌抑制遺伝子 Krev-1 の DNA 配列

ベットにて、細胞コロニーにふきつけ、容易に底面より脱離するものを生理食塩水又は培養液で数回ペトリ皿で洗う事によって除去し、上記 G418 を含む培養液中にてさらに 3 日間培養を続けた。

上記処理後に、生育してきたコロニーを顕微鏡下で観察し、形態的に正常に近くなった（扁平で付着性の強くなった）細胞のコロニーをクロニング・シリンダーにて単離した。その後、数回の再クロニングを繰返し、純粋な単一コロニー細胞、すなわちフラット・リバートラント R16 株（第1図(b)参照）を得た。

(2) フラット・リバートラント R16 株からの cDNA の回収

フラット・リバートラント R16 株より、常法（文献3）に従って全 DNA を抽出し、制限酵素 Sal I によって完全に切断し、0.5~2 μ g / 500 μ l の DNA 濃度において、リガーゼ処理する事により、DNA 断片を環状化させた。この DNA プラスミド混合物を、大腸菌 (AG

を第1図に示す。

この癌抑制遺伝子 Krev-1 について、以下、実施例を示し更に詳細に説明する。

実施例1

癌抑制遺伝子 (Krev-1) の単離

(1) フラット・リバートラントの取得

動物細胞用選択マーカーを含む pCD2 ベクター系（文献1）を用いて常法どおり作製したヒト正常線維芽細胞 cDNA 発現ライブラリー DNA プラスミドを 5 μ g / 10^6 細胞の比率で、カーステン (Kirsten) マウス肉腫ウィルスでトランスフォームした NIH/3T3 細胞（第1図(a)参照）にリン酸カルシウムによるトランスフェクション法（文献2）にて導入した。この細胞を、約1週間、1 mg / ml の G418（ゲンタマイシン）を含むダルベッコ MEM 培養液（10% 仔牛血清を含む）中で培養し、DNA プラスミドを取込んだ細胞を選択した。その後プラスチック製ペトリ皿の底面に付着性の強くなった細胞を選別するために、培養液をビ

-1 株）(Stratagene 社) にハナハン (Hanahan) の方法（文献4）に従ってトランスフォームし、100 μ g / ml アンピシリンに耐性な大腸菌クロンを選択した。これらのクロン中より、カナマイシン（12.5 μ g / ml）耐性のクロンをさらに選び（8クロン）、それらの大腸菌クロンよりプラスミド DNA を常法（アルカリ法、文献3）により抽出した。プラスミド DNA は種々の制限酵素による切断地図を作る事により各クロン間の大まかな構造の異同を検討し、代表的な6クロンについて以下の活性検定を行った。

その結果、これらのうちの1つのクロンが腫瘍細胞をフラット・リバートラントにする能力を有することを見出した。このプラスミドを pKrev-1 と命名した。これを含有する大腸菌 AG-1 (pKrev-1) は昭和63年9月20日工業技術院微生物工業技術研究所に AG-1 (pKrev-1) として寄託され、その微生物受託番号は微工菌寄第10289号 (FE

RMP-10289)である。

上記工程(1)、(2)の概略を第2図に示す。

(3)活性検定

カーステン肉腫ウィルス・トランスフォーム NIH/3T3細胞(DT株) 5×10^5 をコラーゲン・コートした60mmペトリ皿にプレートし、翌日、5 μ gの各プラスミド・クローンDNAをリン酸カルシウム法(文献2)にて、トランスフェクトする。16~24時間後に、25%グリセロールを含む培養液で1分間、細胞を処理し、さらに約24時間培養を続ける。この後、細胞をトリプシン処理により、ペトリ皿より、はがし1mg/ml G418を含む培養液15mlを含む100mmペトリ皿にプレートしなおす。

約24時間後、及び3~4日後に同じ組成の培地で液換えをし、その後毎日細胞コロニーの形態を観察する。

pKrev-1プラスミドでトランスフェクトしたものの場合、全コロニーの4~10%が、

扁平な形態を示し、他のコロニーも増殖がやや遅く、皿の底面への付着性が、コントロールに比べ一般に増していた。

扁平なコロニーをクローン化し、その性質を調べると、正常な細胞の性質に近くなっており、Krev-1遺伝子の発現量も高い事が見出された(表1、第3図参照)。

表1 トランスフェクト細胞の生育特性

細胞形態	倍加時間 (hr)	軟寒天コロニー	
		コロニー 形成率 (%)	大きさ**
NIHneo ⁺ 扁平	19	0.5	—
DTneo ⁺ 癌化	10	72	10-30
R16 扁平	23	0.9	4-10
pKrev-1 によりトランスフェクトしたもの			
F1 扁平	18	5.4	4-10
F2 扁平	17	4.8	4-10
T1 癌化	15	17.3	6-8
T2 癌化	15	15.8	5-10
T/F1 一部扁平	16	5.8	7-9

* 増殖能を有する細胞の数に対する軟寒天培地中のコロニーの数の比率

** 1個の細胞(ほぼ球形)の直径を1単位としたときのコロニーの直径の大きさ

トランスフォーム(癌化)した細胞(DTneo⁺)は、増殖速度が速く(倍化時間10時間)が短い)、軟寒天培地中でコロニー形成能を持っている(72%)。これに対してフラット・リバークラントR16株は、正常細胞(NIHneo⁺)と同様に、増殖速度は遅く(倍化時間23時間)、軟寒天培地中でコロニーは、ほとんど形成しない(0.9%)。F1~T/F1は、Krev-1 cDNAをDT細胞にトランスフェクトして得られた細胞クローンであるが、形態が正常に近いもの(F1、F2)では、トランスフォーム細胞(DT細胞)の性質が著しく抑制されている。この実験は2回繰り返したが、同様の結果が得られた。なおNIH/3T3、DT細胞のいずれにもneo遺伝子(G418耐性遺伝子)を導入し、それぞれNIHneo⁺、DTneo⁺としてコントロールとした。

第3図は、表1で述べたKrev-1トランスフェクト細胞クローン内でのKrev-1遺伝子のコピー数(左パネル)及びmRNA量(中央

パネル)を調べた結果を示したものである。右パネルは、実験に用いた全RNA量が一定であることを示すコントロール実験である。表1の結果と合わせると癌形質の抑制とKrev-1遺伝子の発現との間に相関性がある事が判る。

すなわち、Aは、各細胞のDNA 20μgを、制限酵素BamHIで切断し、0.6%アガロース電気泳動後、DNAを変性させ、ニトロセルロース膜に吸着させ、³²PでラベルしたKrev-1 cDNAと常法(文献3)に従ってハイブリダイズ(2本鎖形成)し、その後、X線フィルムに感光させたものである。またBは、各細胞の全RNA 10μgを、ホルムアルデヒドを含むアガロースゲル(文献3)で電気泳動した後、ニトロセルロースにRNAを吸着させ、Aと同様の処理をしたものである。β-ACTINは、電気泳動に使ったRNAの量及び質をチェックするために、そのコントロールとして上で使ったニトロセルロース膜を洗浄後、再び³²Pでラベルしたβ-ACTIN cDNAとハイブリ

ダイズさせたものである。

(4)構造決定

Krev-1 cDNAを、Bluescriptベクター(Stratagene社、TOY80 コード番号212201~212204)にサブ・クローニングし、常法に従って塩基配列を決定した(Stratagene社、カタログ参照)。この塩基配列を第7図に示す。反応はSequenase(USB社)を用いて行った。

Krev-1 cDNAには唯一の、長いオープン・リーディング・フレームがあり、そのアミノ酸配列と、c-Ha-ras1蛋白のアミノ酸配列とを比較して第4図に示した。

実施例2

Krev-1蛋白(ペプチド(I))の大腸菌を用いた発現

pAR2106ベクターにKrev-1 cDNAのRsaI-RsaI断片(1.25Kb)(第7図の矢印で示す)を組み込み、大腸菌BL21株内でIPTG(イソプロピルβ-D-チオオガラクトピラノシド)処理により、発現させた(文献5)。プ

ラスミドの構築の際、天然Krev-1蛋白の内N-末端の4個のアミノ酸が失われ、その代りに14個の新たなアミノ酸が加わるような構造の遺伝子に改変された(第5図参照)。

実施例3

Krev-1蛋白に対する抗体

Krev-1蛋白アミノ酸配列(第4図)の内、C末端より16個のアミノ酸(T¹¹³~L¹²⁸)に対応するオリゴペプチドを常法により合成し(アブライド・バイオシステム社製ペプチド合成機使用)、ヘモシアニンを担体として、ウサギに免疫し、抗血清を得た。この抗血清は、ウェスタン・ブロット(Western blot)分析法にて、Krev-1 cDNAの構造から予想される分子量(約21,000)の蛋白を検出できる(第6図)。

三角印のバンドがペプチドによる吸収や、抗血清の希釈によって、消える事から、この抗体はKrev-1蛋白に特異的な反応性を持つ事が判る。

文 献

- 1) C. Chen & H. Okayama : Mol. Cell. Biol. 7, 2745-2752, 1987.
- 2) M. Wigler et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1373-1376, 1979.
- 3) T. Maniatis et al. : in Molecular Cloning (New York : Cold Spring Harbor Lab.), 1982.
- 4) D. Hanahan : J. Mol. Biol. 166, 557-580, 1983.
- 5) P. W. Studier & B. A. Moffatt : J. Mol. Biol. 189, 113-130, 1986.
- 6) W. N. Burnette : Ann. Biochem. 112, 195-203, 1981.

[発明の効果・有用性]

本発明の癌抑制遺伝子は、腫瘍細胞を正常細胞に復帰させる能力がある。また、Krev-1遺伝子の作る蛋白質には、癌遺伝子rasの作る蛋白質と構造上一部似た部分があり、進化共通の祖先から由来したものである可能性が示された(第4図)。つまり、「癌抑制遺伝子」のうちの少なくとも一

部は、癌遺伝子と良く似たものであることがはじめて示唆されたので、癌化の分子機構を解明する上で重要な知見と考えられる。また、本発明の癌抑制遺伝子の単離法は今後さらに別の「がん抑制遺伝子」の単離にも適用することができる。

本発明のペプチド (I) は正常細胞内に存在する蛋白であるが、癌細胞中では量的又は質的に変化している可能性が有る。従って、そうした変化を調べるための試薬として、ペプチド (I) ~ (K II) に対する抗体は有用であると予想される。また、これらの抗体を用いて、さらに新しい関連癌抑制蛋白を見出せる可能性が有る。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、NIH/3T3細胞(a)とフラット・リバートント(b)を示す写真である。

第2図は、cDNA発現ライブラリーのトランスフェクションによるフラット・リバートントの単離法の概略を示す図面である。

第3図は、Krev-1トランスフェクト細胞クローン内でのKrev-1遺伝子のコピー数(左パ

ネル)及びmRNA量(中央パネル)を調べた結果を示す電気泳動図である。

第4図は、Krev-1蛋白(ペプチド(I))とc-Ha-ras1蛋白のアミノ酸配列を比較して示すものである。Krev-1蛋白のアミノ酸配列中の(-)は、c-Ha-ras1蛋白のアミノ酸と同一であることを示す。

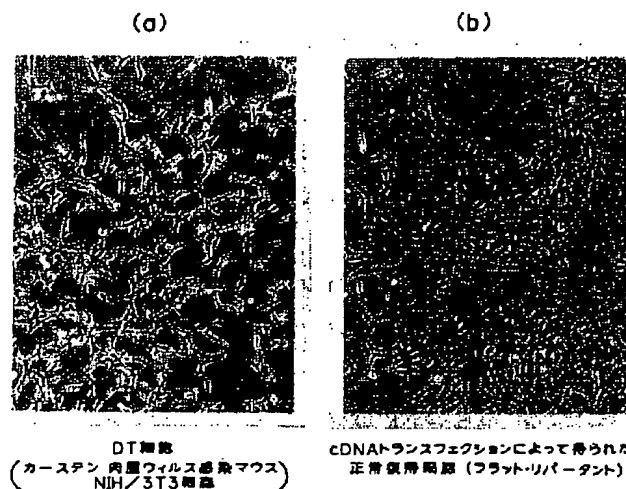
第5図は、大腸菌体内で発現させるために修飾されたKrev-1蛋白のN-末端のアミノ酸配列を示すものである。

第6図は、Krev-1蛋白のC-末端16個の合成オリゴペプチドに対する抗血清の反応性を示す電気泳動図である。

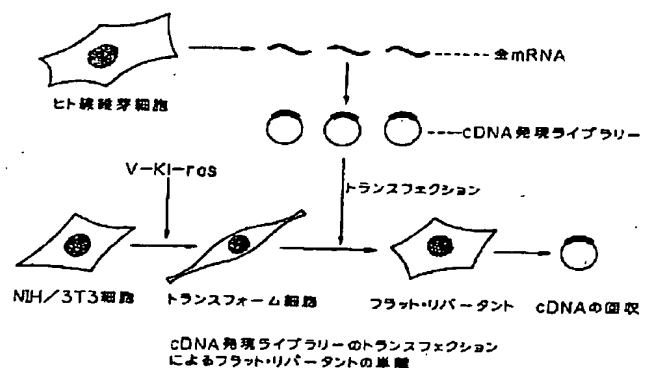
第7図はKrev-1遺伝子のDNA配列を示す図面である。矢印はRsa Iによる切断部位を示す。

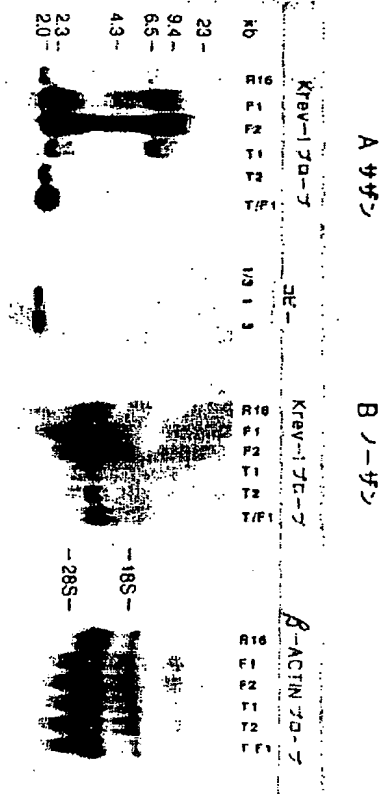
図面の浄書(内容に変更なし)

第 1 図



第 2 図





第 3 図

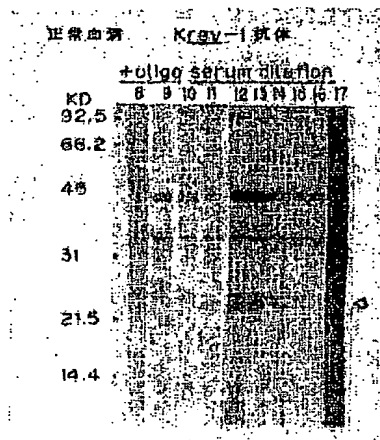
第 5 図

MASMTGGQNGROHKLVVVG---- 組換え Krev-1 蛋白
 MTBYKLVVVG---- 天然 Krev-1 蛋白

第 4 図

c-Ha-ras1	1	MTBYKLVVVG AGGVGKSALT IOLIQNHVPD BYDPTIBDSY RKQVVIQGBT
Krev-1	1	-R-----L- S----- V-PV-GI--B K----- --BV-CQQ
c-Ha-ras1	51	CLLDILDTAG OBEYSAMRDD YMRGEGFLC VFAINNTKSP BDIHQYREQI
Krev-1	51	-M-B----- T-QPT----L --KN-Q--AL -YS-TAQST- N-LQDL----
c-Ha-ras1	101	KRVKSDDDVP MVLVGNKCOL AA RTVBSRQ AQOLARSY G IPYIETSAXT
Krev-1	101	L----TB--- -I----- EDB-V-GKB- G-N---QWCN CARL-S---S
c-Ha-ras1	149	RGGVBDARYT LVRBI RQHX LRKLNPPDES SGPGENSCK CVLS
Krev-1	151	XIN-NBI--D ---Q-N-KTP VEKKKPKKXS CLLL

第 6 图



7 図 5' --- (200-300 層基) ---

[illegible]

第 1 頁の続き

⑤Int. Cl. 5

C 07 K 13/00
C 12 P 21/02
21/08
// (C 12 N 15/12
C 12 R 1:91)
(C 12 P 21/02
C 12 R 1:19)
C 07 K 99:00

識別記号

ZNA

C

庁内整理番号

8318-4H
6712-4B
6712-4B

8318-4H

手 続 補 正 書 (方式)

平成元年 1. 10 日

特許庁長官 吉 田 文 毅 殿

1. 事件の表示 昭和 6 3 年特許願第 2 3 5 7 3 7 号

2. 発明の名称 癌抑制遺伝子、その単離法、それがコードするペプチド、及び抗体

3. 補正をする者

事件との関係 出 願 人

名 称 (679) 理 化 学 研 究 所

4. 代 理 人

住 所 東京都千代田区丸の内 3 丁目 3 番 1 号
電話 (代) 211-8741

氏 名 (5995) 弁 理 士 中 村 稔

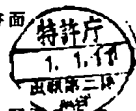


5. 補正命令の日付 昭和 6 3 年 1 2 月 2 0 日

6. 補正の対象 (1) 代理権を証明する書面
(2) 全 図 面

7. 補正の内容 別紙の通り

願書に最初に添付した図面の写本
(内容に変更なし)



This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images
problems checked, please do not report the
problems to the IFW Image Problem Mailbox**